

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-225092

(43)Date of publication of application : 12.08.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12P 13/04

C12P 13/22

(21)Application number : 2002-184469

(71)Applicant : SHOWA DENKO KK

(22)Date of filing : 25.06.2002

(72)Inventor : AOKI YASUSHI
KAMAIKE HARUMI

(30)Priority

Priority number : 2001190867
2001367780Priority date : 25.06.2001
30.11.2001

Priority country : JP

JP

(54) METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new method for readily and efficiently producing an L-amino acid having high optical purity and a new method for readily and efficiently producing an L-amino acid having high optical purity using a cinnamic acid derivative having a substituent on the phenyl group and an acrylic acid derivative having a heterocycle as a raw material.

SOLUTION: Remarkably high phenylalanine derivative-forming activity is found in a phenylalanine ammonia-lyase derived from plants, compared with a conventionally known enzyme derived from microorganisms. Examination results of the activity for forming not only the phenylalanine derivative but also industrially useful amino acids based on the wide substrate specificity of the phenylalanine ammonia-lyase derived from plants allow to solve the problems by using the enzyme.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 20.06.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-225092

(P2003-225092A)

(43) 公開日 平成15年8月12日 (2003.8.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 P 13/04	4 B 0 2 4
C 1 2 P 13/04		13/22	4 B 0 6 4
13/22		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数30 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2002-184469 (P2002-184469)
(22) 出願日 平成14年6月25日 (2002.6.25)
(31) 優先権主張番号 特願2001-190867 (P2001-190867)
(32) 優先日 平成13年6月25日 (2001.6.25)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(31) 優先権主張番号 特願2001-367780 (P2001-367780)
(32) 優先日 平成13年11月30日 (2001.11.30)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002004
昭和電工株式会社
東京都港区芝大門1丁目13番9号
(72) 発明者 青木 裕史
千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号
昭和電工株式会社研究開発センター
(72) 発明者 蒲池 晴美
千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号
昭和電工株式会社研究開発センター
(74) 代理人 100118740
弁理士 柿沼 伸司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-アミノ酸の製法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、簡便で効率よく光学純度の高いL-アミノ酸を得る新規な方法を提供することを課題の一つとし、フェニル基上に置換基を持つ桂皮酸誘導体や複素環を有するアクリル酸誘導体を原料として、簡便で効率よく光学純度の高いL-アミノ酸を得る新規な方法を提供することを課題の一つとする。

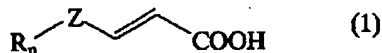
【解決手段】 植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼに、従来知られる微生物由来の同酵素に比べ、著しく高いフェニルアラニン誘導体生成活性があることを見出し、これら植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼの広い基質特異性に着目し、フェニルアラニン誘導体のみでなく、産業上有用な様々のアミノ酸の生成活性について検討した結果、これら酵素を用いることにより、上記課題を解決可能となった。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記式(1)

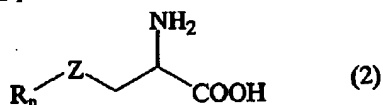
【化1】



(但し、式中Zはヘテロ原子を含んでもよい芳香環基を、Rは該芳香環上の置換基を表し、nは0以上の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異な

(2)

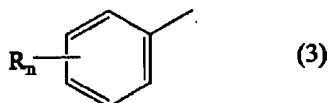
【化2】



(但し、式中Zはヘテロ原子を含んでもよい芳香環基を、Rは該芳香環上の置換基を表し、nは0以上の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異な

【請求項2】 $R_n - Z -$ が下記式(3)

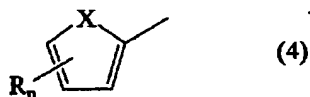
【化3】



(但し、Rは、ベンゼン環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシ

【請求項3】 $R_n - Z -$ が下記式(4)

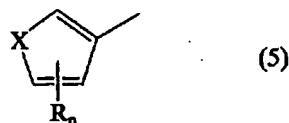
【化4】



(但し、式中XはS、O、NHまたは NR^1 を表し、 R^1 は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rはヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異な

【請求項4】 $R_n - Z -$ が下記式(5)

【化5】



(但し、式中XはS、O、NHまたは NR^1 を表し、 R^1 は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rはヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異な

【請求項5】フェニルアラニンアンモニアリアーゼを含む植物培養細胞及び/またはその処理組成物を用いることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

【請求項6】フェニルアラニンアンモニアリアーゼを含む植物組織処理組成物を用いることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

【請求項7】植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子を植物中において発現可能に存在させ、その形質転換植物栽培物または該栽培物の処理物を用いることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

【請求項8】植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子を微生物中において発現可能に存在させ、その形質転換微生物培養物、処理物または培養物から得た酵素を用いることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

【請求項9】植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子が、*Lithospermum erythrorhizon*由来のp a l 2 遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と70%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子である請求項7または8に記載のL-アミノ酸の製法。

【請求項10】植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子が、*Lithospermum erythrorhizon*由来のp a l 2 遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子である請求項7または8に記載のL-アミノ酸の製法。

【請求項11】フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の由来植物が、*Lithospermum*属及び/または*Camellia*属であることを特徴とする請求項1ないし8のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

【請求項12】微生物が細菌、酵母及び/または糸状菌である請求項8ないし11のいずれかに記載のL-アミ

ノ酸の製法。

【請求項 13】細菌が大腸菌である請求項 12 に記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 14】前記式 (3) の R の少なくとも一つが水、酸基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 15】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つがシアノ基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 16】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つがカルボキシル基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 17】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つがアミド基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 18】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つがハロゲン基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 19】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つがアミノ基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 20】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つがニトロ基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 21】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つがヒドロキシメチル基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 22】前記式 (3) の置換基 R の少なくとも一つが炭素数 1~6 のアルキル基である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 23】前記式 (3) の置換基 R がシアノ基、水酸基、ニトロ基またはカルボキシル基のいずれかであり、n が 1 である請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 24】L-アミノ酸が L-フェニルアラニンであることを特徴とする請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 25】前記式 (4) の X が O である請求項 3、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 26】前記式 (4) の X が S である請求項 3、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 27】前記式 (4) の X が NH である請求項 3、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 28】前記式 (5) の X が O である請求項 4 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 29】前記式 (5) の X が S である請求項 4 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 30】前記式 (5) の X が NH である請求項 4 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物酵素の作用によりアクリル酸誘導体にアンモニアを付加し、対応する光学活性アミノ酸を得る製法に関する。光学活性アミノ酸は、医薬、農薬、その他精密化学品の合成原料として有用である。

【0002】

【従来の技術】光学活性アミノ酸を得る方法としては、不斉触媒を利用した有機合成的反応、また微生物の特異性を生かした発酵的製法が多数検討されている。

【0003】光学活性フェニルアラニンを得る製法の一つとして、桂皮酸に、微生物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼあるいは該酵素活性を有する微生物体を作用させ、光学選択的に光学活性フェニルアラニンを得る方法は、英国特許第 1489468 号、特開昭 53-96388 号公報等、多数報告されている。これらは高アンモニア濃度下、同酵素の作用により桂皮酸の α -炭素にアミノ基を付加する反応を利用したものであり、光学純度よく L-フェニルアラニンを生成することができ。

【0004】フェニル基上に置換基を持つ、光学活性 L-フェニルアラニン誘導体を得る方法としては、L-フェニルアラニンに対し種々の修飾反応を用いてフェニル基上に置換基を導入する方法が考えられる。しかしながらこうした方法では、フェニル基以外の部分の副反応による収率の低下、及び過酷な反応条件下でのラセミ化の進行による光学純度の低下が避けられない。また導入する置換基のフェニル基上での位置特異性を得ることも困難であることから、低収率・分離精製の困難を来すため、実用的でない。

【0005】そこで、前出のフェニルアラニンアンモニアリアーゼを利用し、あらかじめ所望の置換基が導入された置換フェニル基をもつ桂皮酸誘導体に、当該酵素を作用させる方法が考えられる。酵素反応は温和な条件下で進行するため、フェニル基およびフェニル基上の置換基に対し何ら副反応による弊害を与えず、純度よく光学活性 L-フェニルアラニン誘導体を与えると期待される。

【0006】しかしながら、微生物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼの基質特異性は一般に厳密であり、置換フェニル基に対する反応性は、本来の反応である桂皮酸から L-フェニルアラニンの反応に比べ著しく低い、またはほとんど反応しない場合が多い。例えば、フッ素化フェニル基を有する桂皮酸誘導体を原料とし、同酵素の作用により光学活性フッ素化フェニルアラニンを得る方法（特開昭 63-14892 号公報）、また *Rhodotoru la* 属の特定の微生物を用いたフェニルアラニン誘導体を得る方法（米国特許第 5981239 号）など少数の事例が開示されているにすぎず、適用できる化合物は限定されており、またその生産性も工業的には十分とはいえないも

のであった。

【0007】一般にフェニルアラニンアンモニアリアーゼは動物・植物・微生物の生物界全般に分布していることが知られている。すなわち微生物では *Rhodotorula rubra* (特開昭61-043993号公報、GB1489468)、*Rhodospiridium toruloides* (特開昭60-227670号公報)、*Cladosporidium cladosporioides* (特開昭62-111687号公報) などであり、その他にも多くの報告がある。

【0008】一方植物では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、チャ (*Camellia sinensis*)、ヒヨコマメ (*Cicer arietinum*)、レモン (*Citrus limon*)、キュウリ (*Cucumis sativus* L.)、ニンジン (*Daucus carota*)、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*)、トマト (*Lycopersicon esculentum*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、イネ (*Oryza sativa*)、バセリ (*Petroselinum crispum*, *Petroselinum hortense*)、テーダマツ (*Pinus taeda*)、ポプラ (*Populus kitakamienensis* 等)、サクランボ (*Prunus avium*)、キイチゴ (*Rubus idaeus*)、ナス (*Solanum tuberosum*)、*Stylosanthes humilis*、シャジクソウ (*Trifolium subterraneum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 等が知られている。

【0009】また、植物に由来するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ構造遺伝子 *pal* (以下「*pal* 遺伝子」と記載する。) もまた、既に多くのものが報告されている。すなわち、イネ (*Oryza sativa*, *Biochim. Biophys. Acta* (1993), 1171(3), 321-322, *Plant Mol. Biol.* (1995), 29(3), 535-550)、チャ (*Camellia sinensis*, *Theor. Appl. Genet.* (1994), 89(6), 671-675)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.* (1995), 27, 327-338)、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*, *Biosci. Biotech. Biochem.* (1997), 61(12), 1995-2003)、トマト (*Lycopersicon esculentum*, *J. Biol. Chem.* (1992), 267, 11824-11830)、シャジクソウ (*Trifolium subterraneum*, *Gene* (1994), 138(1-2), 87-92)、エンドウマメ (*Pisum sativum*, *Plant Mol. Biol.* (1992), 20(1), 167-170, 特開平5-153978号公報)、ポプラ (*Populus trichocarpa*, *Plant Physiol.* (1993), 102, 71-83)、タバコ (*Nicotiana tabacum*, *Plant Mol. Biol.* (1996), 30, 711-722)、ダイズ (*Glycine max*, *DNA Sequence* (1991), 1(5), 335-346)、サツマイモ (*Ipomoea batatas*, *Plant Physiol.* (1989), 90(4), 1403-1407)、小麦 (*Triticum aestivum*)、バセリ (*Petroselinum crispum*)、ひまわり (*Helianthus annuus*)、アルファルファ (*Medicago sativa*) などであり、同種の植物中に存在する異性体や部分配列のみが明らかにされているものを含めるとその数は40種以上上る。

【0010】植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼは相互に多くの保存配列を有し、そのアミノ酸配

列は最も低いものでも50%以上の相同性を示し、その機能・性質には共通点が多いことが推測できる。

【0011】植物に由来するフェニルアラニンアンモニアリアーゼは、植物の二次代謝におけるフェニルプロパノイド・イソフラボノイド合成経路の最初でありかつ律速段階の反応を触媒する、すなわちフェニルアラニンの脱アンモニア反応を触媒する酵素として知られ、植物のストレス耐性に関わる酵素およびその遺伝子としてその機能が詳細に研究されている。また *pal* 遺伝子を植物体中で発現させ病害耐性植物を作出する試みも、基礎・応用に渡って広く試みられている。

【0012】以上のように多くの研究報告が存在するにもかかわらず、微生物由来の同酵素とは違い、物質生産という観点からの研究は、フェニルプロパノイド・イソフラボノイド系のいくつかの有用物質含量を高める試みが行われているものの (*Planta* (1979), 14(6), 369-376., *Biochem. Biophys. Acta* (1979), 563, 278-292.)、一般的な工業材料となる有機化合物を製造する試みは知られていない。もちろん、逆反応であるアミノ基付加反応を用いて物質生産を行う試みは全く報告されていない。そもそも植物由来の酵素は、同酵素に限らず、安定性の低さ、基質特異性の高さなどの点から微生物酵素に比して実用性が低いとの通念から物質生産に用いられる例は極めて少なく、当業者が本発明と同様な有機化合物のL-フェニルアラニン誘導体の製法を考案する際に、同じ触媒機能を有する酵素が他起源に存在する限り最も注目しない材料の一つであった。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、簡便で効率よく光学純度の高いL-アミノ酸を得る新規な方法を提供することを課題の一つとし、フェニル基上に置換基を持つ桂皮酸誘導体などのアクリル酸誘導体を原料として、簡便で効率よく光学純度の高いL-アミノ酸を得る新規な方法を提供することを課題の一つとする。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼの広い基質特異性に着目し、産業上有用な様々のアミノ酸の生成活性について検討した。

【0015】まず、フェニル基に置換基を有する桂皮酸誘導体に対し、より反応性の高いアンモニアリアーゼを、動物・植物・微生物の生物界全般にわたり探索した。

【0016】その結果、本発明者らはこれら植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼに、従来知られる微生物由来の同酵素に比べ、著しく高いフェニルアラニン誘導体生成活性があることを見出した。先述したように、これら酵素の関与する植物体内でのフェニルプロパノイド、イソフラボノイド等の生成過程については詳細に検討がなされてきたが、これはフェニルアラニンのア

ミノ基脱離反応による桂皮酸誘導体の生成に関するものであり、その逆反応、すなわちこれら植物酵素による桂皮酸誘導体へのアミノ基付加、フェニルアラニン誘導体生成の可能性については検討されていなかった。

【0017】さらにこれら植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼの広い基質特異性に着目し、フェニルアラニン誘導体のみでなく、産業上有用な様々のアミノ酸の生成活性について検討した結果、これら酵素に、置換基を有する、ヘテロ原子を含んでもよい芳香環構造を有するアクリル酸誘導体を基質として、対応するL-アミノ酸を生成する活性を見出した。

【0018】本発明者らはさらに鋭意研究を重ねた結果、植物由来のp a l遺伝子を高発現する微生物を用いることにより非常に高い効率でアミノ酸を製造しうることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0019】従来、植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼにおいて、前記式(1)で示される構造を有するアクリル酸誘導体を基質として、アミノ酸を得る反応を触媒する能力は知られておらず、発明者らにより新規に得られた知見である。

【0020】また、植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼにおいて、前記式(3)で示される、フェニル基上に各種置換基をもつ桂皮酸誘導体を基質として、フェニルアラニン誘導体を得る反応を触媒する能力は知られておらず、発明者らにより新規に得られた知見である。

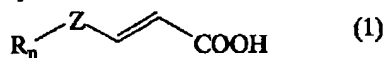
【0021】また、植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼにおいて、前記式(4)または(5)で示される、複素環型の置換基をもつアクリル酸誘導体を基質として、L-アミノ酸を得る反応を触媒する能力は知られておらず、発明者らにより新規に得られた知見である。

【0022】すなわち、本発明は、下記[1]～[30]の事項に関する。

[1] 下記式(1)

【0023】

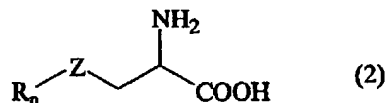
【化6】



【0024】(但し、式中Zはヘテロ原子を含んでいてもよい芳香環基を、Rは該芳香環上の置換基を表し、nは0以上の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。)で示されるアクリル酸誘導体に、アンモニアの存在下、植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼを作用させることを特徴とする、下記式(2)

【0025】

【化7】

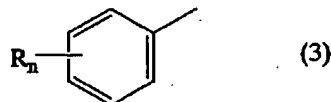


【0026】(但し、式中Zはヘテロ原子を含んでいてもよい芳香環基を、Rは該芳香環上の置換基を表し、nは0以上の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。)で示されるL-アミノ酸の製法。

[2] $R_n - Z -$ が下記式(3)

【0027】

【化8】

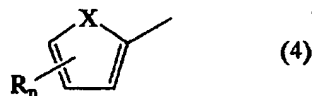


【0028】(但し、Rは、ベンゼン環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～5の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。)である上記[1]に記載のL-アミノ酸の製法。

[3] $R_n - Z -$ が下記式(4)

【0029】

【化9】



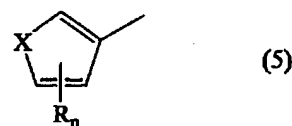
【0030】(但し、式中XはS、O、NHまたはNR¹を表し、R¹は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rはヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。)である上記

[1]に記載のL-アミノ酸の製法。

[4] $R_n - Z -$ が下記式(5)

【0031】

【化10】



【0032】(但し、式中XはS、O、NHまたはNR¹を表し、R¹は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rは

ヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1~6のアルキル基または炭素数1~6のアルコキシ基を表す。nは0~3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているいてもよい。)である上記

[1]に記載のL-アミノ酸の製法。

[0033] [5] フェニルアラニンアンモニリアーゼを含む植物培養細胞及び/またはその処理組成物を用いることを特徴とする上記[1]ないし[4]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[6] フェニルアラニンアンモニリアーゼを含む植物組織処理組成物を用いることを特徴とする上記[1]ないし[4]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[7] 植物由来のフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子を植物中において発現可能に存在させ、その形質転換植物栽培物または該栽培物の処理物を用いることを特徴とする上記[1]ないし[4]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0034] [8] 植物由来のフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子を微生物中において発現可能に存在させ、その形質転換微生物培養物、処理物または培養物から得た酵素を用いることを特徴とする上記[1]ないし[4]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[9] 植物由来のフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子が、*Lithospermum erythrorhizon*由来のp a l 2遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と70%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子である上記[7]または[8]に記載のL-アミノ酸の製法。

[10] 植物由来のフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子が、*Lithospermum erythrorhizon*由来のp a l 2遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子である上記[7]または[8]に記載のL-アミノ酸の製法。

[0035] [11] フェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子の由来植物が、*Lithospermum*属及び/または*Camellia*属であることを特徴とする上記[1]ないし[8]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[12] 微生物が細菌、酵母及び/または糸状菌である上記[8]ないし[11]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[13] 細菌が大腸菌である上記[12]に記載のL-アミノ酸の製法。

[0036] [14] 前記式(3)のRの少なくとも一つが水酸基である上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[15] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つがシアノ基である上記[2]、[5]ないし[13]のい

れかに記載のL-アミノ酸の製法。

[16] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つがカルボキシル基である上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0037] [17] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つがアミド基である上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[18] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つがハロゲン基である上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[19] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つがアミノ基である請求上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0038] [20] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つがニトロ基である請求上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[21] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つがヒドロキシメチル基である上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[22] 前記式(3)の置換基Rの少なくとも一つが炭素数1~6のアルキル基である上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0039] [23] 前記式(3)の置換基Rがシアノ基、水酸基、ニトロ基またはカルボキシル基のいずれかであり、nが1である上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[24] L-アミノ酸がL-フェニルアラニンであることを特徴とする上記[2]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0040] [25] 前記式(4)のXがOである上記[3]、[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[26] 前記式(4)のXがSである上記[3]、

[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[27] 前記式(4)のXがNHである上記[3]、

[5]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0041] [28] 前記式(5)のXがOである上記[4]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0042] [29] 前記式(5)のXがSである上記[4]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[30] 前記式(5)のXがNHである上記[4]ないし[13]のいずれかに記載のL-アミノ酸の製法。

[0043]

【発明の実施の形態】以下本発明について詳細に説明する。本発明のL-アミノ酸の製法は、種々の置換基を有してもよく、またヘテロ原子を含んでもよい芳香環基を

有するアクリル酸誘導体より、光学活性なアミノ酸を、1段階の酵素反応で簡便に得ることができるものである。

【0044】また本発明のL-アミノ酸の製法は、種々の置換基を有するベンゼン環基をもつアクリル酸誘導体より、光学活性なアミノ酸を、1段階の酵素反応で簡便に得ることができるものである。

【0045】あらかじめベンゼン環基に導入された置換基、例えばシアノ基、水酸基、カルボキシ基、アミド基、ハロゲン、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1~6のアルキル基は、本反応の温和な条件下では影響を受けることなく反応の終了まで保持され、対応する所望のL-フェニルアラニン誘導体をほぼ100%の変換率で収率よく得ることができる。

【0046】また、本発明のL-アミノ酸の製法は、複素環構造を有するアクリル酸誘導体より、複素環構造を有する光学活性なアミノ酸を、1段階の酵素反応で簡便に得ることができる。

【0047】当該アクリル酸誘導体中のフリル基、チエニル基、ピロール基等の複素環構造は、本反応の温和な条件下では影響を受けることなく反応の終了まで保持され、対応する所望のL-アミノ酸をほぼ100%の変換率で収率よく得ることができる。

【0048】なお本発明の反応原料となる、種々の置換基を有するアクリル酸誘導体は、任意の置換基が導入されたアルデヒド誘導体のアルデヒド基と無水酢酸を作用させる、いわゆるパーキン反応による方法 (Arch. Pharm. (Weinheim) (1994), 327(10), 619-625等を参照)、もしくはヒリジン溶媒中、ヒペリジンの存在下マロン酸などを作用させる方法 (J. Chem. Soc. (1939), 357-360等を参照)、ほか種々の改法 (Synth. Commun. (1999), 29(4), 573-581等を参照) 等により容易に調製される。

【0049】本発明において適用される、フェニルアラニンアンモニリアーゼ活性を提供する植物には特に制限はない。具体的には先述したごとく、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、チャ (*Camellia sinensis*)、ヒヨコマメ (*Cicer arietinum*)、レモン (*Citrus Limonis*)、キュウリ (*Cucumis sativus* L.)、ニンジン (*Daucus carota*)、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*)、トマト (*Lycopersicon esculentum*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、イネ (*Oryza sativa*)、パセリ (*Petroselinum crispum*, *Petroselinum hortense*)、テーダマツ (*Pinus taeda*)、ポプラ (*Populus kitalamiensis* 等)、サクランボ (*Prunus avium*)、キイチゴ (*Rubus idaeus*)、ナス (*Solanum tuberosum*)、スタイロー (*Stylosanthes humilis*)、シャジクソウ (*Trifolium subterraneum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 等が知られるが、植物にほぼ普遍的に存在する酵素である。

【0050】本発明の実施形態の一つとしては、植物より分離されたフェニルアラニンアンモニリアーゼを用いる。すなわち、植物より酵素を分離精製するための公知の方法、たとえば摩砕した植物体の抽出液からアセトン分画沈殿、硫酸沈殿、各種分離カラムなどの常法により分離精製された該酵素を反応触媒として供することができる。種々の植物体からの具体的なフェニルアラニンアンモニリアーゼの分離精製法としては、J. Kouko1らの報告 (J. Biol. Chem. (1961), 236(10), 2692-2698)、E. A. Havirらの報告 (Biochemistry (1973), 12, 1583-) 等が知られる。

【0051】また本発明の異なる実施形態の一つとして、前記のごとき植物体の処理物を、目的反応に供する。植物体の処理物としては、例えば植物体の摩砕物・凍結乾燥物や抽出液、さらに抽出液から目的反応を触媒する成分を濃縮・抽出したもの、また、これら植物体の処理物や抽出液、抽出成分を、難溶性の担体に固定化したもの、等を反応に供することができる。

【0052】このような固定化担体としては、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリ-N-ビニルホルムアミド、ポリアリルアミン、ポリエチレンイミン、メチルセルロース、グルコマンナン、アルギン酸塩、カラギーナン等、さらにこれらの(架橋)重合物など、植物抽出成分を包含した水難溶性の固形分を形成するような化合物を単独もしくは混合して用いることができる。

【0053】また本発明の異なる実施形態の一つとして、該植物体の培養細胞を用いる。すなわち、植物の培養細胞を得る一般的方法、例えば、インドール酢酸やカイネチン等の植物ホルモンの存在下、Murashige & Skoog完全培地、LS培地、MS培地、Gamborg B-5培地など、植物の種類に応じて選択される種々の公知の植物細胞培地により培養し、得られた培養細胞を反応に供する。この際、フェニルアラニンアンモニリアーゼ活性を高めるよう改変された培地・培養条件を用いてもよい。

【0054】例えば *Lithospermum erythrorhizon* の、該酵素活性を誘導された培養細胞を得る培養条件として、Yazakiらの報告 (Biosci. Biotech. Biochem. (1997), 61(12), 1995-2003)、また *Petroselinum hortense* の培養細胞における、該酵素活性と培養条件の関係についてのKlausらの報告 (Archiv. Biochem. Biophys. (1975), 66, 54-62) 等が知られる。また、このようにして得られた植物培養細胞の摩砕物・凍結乾燥物や抽出液、さらに抽出液から目的反応を触媒する成分を濃縮・抽出したもの、さらには、植物培養細胞の抽出液、抽出成分を難溶性の担体に固定化したもの等を、反応に供することができる。

【0055】さらに本発明の異なる実施形態の一つとして、植物に由来する *pal* 遺伝子を微生物あるいは植物に導入して発現可能に存在させ、該形質転換微生物ある

いは形質転換植物を用いることもできる。遺伝子発現に用いる宿主生物は、外来遺伝子を取り込み、発現する方法が知られているものであれば特に制限は無い。このような生物としては、例えば、*Escherichia*属、*Pseudomonas*属、*Bacillus*属などの細菌、*Saccharomyces*属、*Schizosaccharomyces*属などの酵母、*Aspergillus*属などの糸状菌を用いることができる。

【0056】本発明において用いるp a l遺伝子は、天然に存在するp a l遺伝子の他、同じ機能を有する（同じ活性の変異体酵素をコードする）遺伝子であってもよく、例えば、*Lithospermum erythrorhizon*由来のp a l 2遺伝子（データベースアクセスNo. D83076）、もしくは*Lithospermum erythrorhizon*由来のp a l 2遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と70%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードするp a l 遺伝子、好ましくは、*Lithospermum erythrorhizon*由来のp a l 2遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と80%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードするp a l 遺伝子が挙げられる。植物p a l 遺伝子の配列相同性が十分に高いこと、植物体中で果たしている機能が同一であることから、機能・性質等に共通点が多く、本製法においては同等の効果が期待できることは先述した通りである。

【0057】該酵素遺伝子cDNAの植物からの単離、および該遺伝子を用いた形質転換微生物の作成方法、また該形質転換微生物より該酵素を分取する方法等については、例えば*Lithospermum erythrorhizon*を用いた事例としてYazakiらの報告（*Biosci. Biotech. Biochem.* (1997), 61(12), 1995-2003）、また*Petroselinum crispum*を用いた事例としてW. Schulzらの報告（*FEBS Letter* (1989), 258(2), 335-338）等、多数知られる。

【0058】次に、p a l 遺伝子の取得法、発現可能なプラスミドの作製法、及びこれらのプラスミドの各種生物への導入・発現法の例についてさらに詳しく説明する。

<p a l 遺伝子の取得法>植物由来のフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子p a l は、公知の手法により作成したcDNAライブラリーから、フェニルアラニンアンモニリアーゼの保存配列に相当する部分断片をプローブとして取得することができる。まず、必要なcDNAの取得には、従来のmRNAを単離精製した後にこれを鋳型にし、Reverse transcriptaseを用いて得ることもできるが、近年では耐熱性のReverse transcriptaseを用い、total RNAかmRNAを鋳型としたPCR法で容易に十分な量のcDNAを得ることができる。こうして得たcDNAを適当なプラスミドベクター、例えばpBR322やpUC18などに接続し、宿主とする大腸菌を形質転換する。

【0059】上記のようにして作成したcDNAライブラリーから目的のp a l 遺伝子を取得するには、フェニルアラニンアンモニリアーゼの保存配列をコードするオリ

ゴDNAをプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーション法により得ることができる。先述した通り植物由来のフェニルアラニンアンモニリアーゼは配列の全体に渡って保存配列と推定される相同性の高い配列が存在し、目的に応じた位置を選択してプローブとなるオリゴDNAを作成し、用いることができる。

【0060】コロニーハイブリダイゼーションにより得られたポジティブ候補形質転換体からプラスミドを調整し、適当なプライマーを組み合わせてPCRを行うことにより、プラスミドに挿入されたp a l 遺伝子の位置と方向を確認することができる。多くの植物由来p a l 遺伝子の一次配列がGen Bank、EMBLのごときデータベース上に公開されているので、配列情報が存在するものに関しては制限酵素マップを作成することにより位置・方向を確認することもできる。

【0061】<発現プラスミドの作製法および製造に用いる組換え微生物の作製法>p a l 遺伝子は適当なベクター（具体例は後述）により、大腸菌等の細菌、*Saccharomyces cerevisiae*等の酵母等の微生物、好ましくは大腸菌等の細菌に導入し、発現させることにより、目的のフェニルアラニン誘導体生成活性を有する組換え体を得ることができる。生成したフェニルアラニン誘導体は、後述するように微生物反応生成物を反応物から分離するための通常の方法により単離精製することができる。

【0062】外来遺伝子を含むプラスミドの作製法、大腸菌等の微生物へのプラスミドの導入および発現のための手順ないし方法は、遺伝子工学の分野で慣用されている手法ないし方法（たとえば、"Vectors for cloning genes", *Methods in Enzymology*, 216, p. 469-631, 1992, Academic Press、および、"Other bacterial systems", *Methods in Enzymology*, 204, p.305-636, 1991, Academic Press参照）に準じて実施すればよい。

【0063】大腸菌への外来遺伝子（p a l 遺伝子群）の導入法は、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それを用いて行えばよい（たとえば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning - A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照）。大腸菌での外来遺伝子の発現は常法に従って行えばよく（たとえば、前述の "Molecular cloning - A laboratory manual."参照）、pUC系やpBluescript系等のlacのプロモーター等を有する大腸菌用ベクターを用いて行うことができる。本発明者等は、lacのプロモーター等を有する大腸菌用ベクターpBluescript II SK-を用いて、lacのプロモーターの下流にp a l 遺伝子を挿入し、大腸菌で発現させた。

【0064】酵母*Saccharomyces cerevisiae*へのp a l 遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい（たとえば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニュー

バイオテクノロジー」医学出版センター刊参照)。酵母での外来遺伝子の発現は、PGKやGPD (GAP)等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写制御を受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、*S. cerevisiae*のベクター、たとえば、YRp系(酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター)、YE p系(酵母の2 μ m DNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター)、YIp系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター)等のベクターに挿入することにより行うことができる(前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊 参照)。

【0065】<組換え微生物の培養法>本発明に関連する形質転換体の培養は、宿主微生物の一般的な培養法に準じて行うことができる。形質転換微生物を培養するための培地炭素源としては、宿主微生物が炭素源とすることができるもの、例えばグルコースやシュクロース、フルクトース、蔗糖等の糖類、エタノールや酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、安息香酸、脂肪酸などの有機物又はこれらのアルカリ金属塩、*n*-パラフィンなどの脂肪族炭化水素類、また例えばペプトン、肉エキス、魚エキス、大豆粉、ふすま、麦芽抽出物、ジャガイモ抽出物等の天然有機物を、単独あるいはこれらの組み合わせにより、通常0.01%~30%、好ましくは0.1%~10%程度の濃度で用いることができる。例えば大腸菌を形質転換体として用いる場合、グルコース、ペプトン、肉エキス、麦芽抽出物等が好適に用いられる。

【0066】微生物を培養するための培地窒素源としては、宿主微生物が窒素源とすることができるもの、例えば硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの無機窒素化合物、また尿素、尿酸などの含窒素有機物、ペプトン、肉エキス、魚エキス、大豆粉、麦芽抽出物、ジャガイモ抽出物等の天然有機物を、単独あるいはこれらの組み合わせにより、通常0.01%~30%、好ましくは0.1%~10%程度の濃度で用いることができる。例えば大腸菌を形質転換体として用いる場合には、硫酸アンモニウム、ペプトン、肉エキス、麦芽抽出物等が好適に用いられる。

【0067】さらに必要に応じて、リン酸2水素カリウム等のリン酸塩；硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、酢酸カルシウム、塩化マンガン、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、硫酸ニッケルなどの金属塩が菌の生育改善のために添加される。添加濃度は培養条件により異なるものの、通常、リン酸塩に関しては0.01%~5%、マグネシウム塩においては10ppm~1%、他の化合物では0.1ppm~1000ppm程度である。また選択する培地により、ビタミン類、アミノ酸、核酸などの供

給源として例えば酵母エキス、カザミノ酸、酵母核酸を1ppm~100ppm程度添加することにより、菌の生育を改善することができる。

【0068】さらに必要に応じ、形質転換に供された該酵素遺伝子を宿主微生物で高度に発現させるため、ベクターの発現プロモーターに対応する誘導物質を培養中に添加することができる。例えばLacプロモーターを用いる場合はIPTG(イソプロピル-1-チオ- β -D-ガラクトシド)を0.01mM~10mM程度、またアンピシリンやカナマイシン等の薬剤耐性プロモーターを用いる場合は対応する薬剤を0.1ppm~1000ppm程度添加する。

【0069】いずれの組成を用いた場合も培養のpHは、5~9、好ましくは5.5~8に調整される。また以上のごとき培地であらかじめ培養された微生物菌体を、遠心分離、膜ろ過などの方法により培養液から分取し、反応に供することは、培養液から持ち込まれる夾雑物を低減し、のちの生成物の分取を簡便にするために有用である。

【0070】培養して得た形質転換微生物は、そのまま遠心分離や膜分離など公知の方法により回収して、あるいは培養液そのものを目的反応に供することができる。さらには、形質転換微生物を破碎、凍結、乾燥処理したもの、微生物菌体からの無細胞抽出液、さらに無細胞抽出液から目的反応を触媒する成分を濃縮・抽出したものの、またこれら形質転換微生物菌体およびその処理物、抽出液、抽出成分を、難溶性の担体に固定化したもの等を反応に供することができる。

【0071】このような目的に供される固定化担体としては、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリ-N-ビニルホルムアミド、ポリアリルアミン、ポリエチレンイミン、メチルセルロース、グルコマンナン、アルギン酸塩、カラギーナン等、さらにこれらの(架橋)重合体など、微生物もしくはその抽出成分を包含した水難溶性の固形物を形成するような化合物を、単独もしくは混合して用いることができる。また、活性炭、多孔質セラミックス、グラスファイバー、多孔質ポリマー成型体、ニトロセルロース膜など、あらかじめ固形物として形成された物体上に形質転換微生物もしくはその抽出液、抽出成分を保持させたものを用いることもできる。

【0072】<製造に用いる組換え植物の作製法および培養法>前述のように、pal遺伝子を該細胞に導入することによりフェニルアラニン誘導体を産出する植物を作製することができる。好ましい例として例えば、前述のpal遺伝子を含むプラスミドを作製し、これをタバコなどの適切な植物に導入し、発現させることにより、目的とするフェニルアラニン誘導体を産生する植物を得ることができる。植物に各種遺伝子を導入し発現させる手法に関しても多くの研究論文が発表されており、これ

ら公知の手法により目的の活性が増大された植物を得ることができる(Plant Mol. Biol. (1999), 39(4), 683-693, Plant Biotechnol. (Tokyo) (1998), 15(4), 189-193, Plant Physiol. (1996), 112(4), 1617-1624)。

【0073】植物への外来遺伝子の導入法は、植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* を介する方法、エレクトロポレーション法、パーティクルガンを用いる方法等が知られており、導入したい植物の種類に応じてこれらの方法を使い分けることができる。プロモーターは、全高発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターを始めとして、種々の器官特異的に発現するものも使うことができる。CaMV 35Sプロモーターを含んだバイナリーベクター pBI121 は Clontech 社より入手でき、*Agrobacterium tumefaciens* を介するためのベクターとして、広く使われているものである。p1 遺伝子は、パーティクルガンを用いることにより、タバコ等の植物に導入でき、p1 遺伝子が発現し、機能することがすでに示されている(Shokubutsu Soshiki Baiyo (1995), 12(2), 165-171)。

【0074】外来遺伝子を含むプラスミドの作製法、植物(葉、茎、根等の細胞)へのプラスミドの導入および発現のための手順ないし方法は、本発明において示したところ以外のものにおいても、植物の遺伝子工学の分野により慣用されているものを含み、その手法ないし方法(たとえば、石田功、三沢典彦、細胞工学実験操作入門、講談社、1992参照)に準じて実施すればよい。以上のようにして作成した組換え植物は、先述のごとき植物細胞培養の一般的な手法に準じて行うことができる。

【0075】本発明における、L-アミノ酸の生成反応は、以上のごとき種々の公知の方法で調製される植物由来フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、該酵素活性を有する植物体処理物または植物培養細胞、もしくは該植物より単離された該酵素遺伝子で形質転換された微生物により生産された該酵素、または形質転換微生物菌体及びその処理物、さらには該酵素遺伝子で形質転換された植物により生産された該酵素、または形質転換植物体及びその処理物の存在下、反応原料としてアクリル酸誘導体を 1 ppm ~ 20%、好ましくは 10 ppm ~ 10%、またアンモニアを終濃度として 2 M ~ 12 M となるよう添加し、さらに pH を 8.5 ~ 11、好ましくは 9 ~ 10.5 となるよう調整し、1 時間 ~ 200 時間程度反応することにより達せられる。

【0076】pH を調整するために用いる酸としては、硫酸、塩酸、リン酸、ホウ酸、炭酸等の無機酸、また蟻酸、酢酸、プロピオン酸等の有機酸及びこれらの塩を用いることができる。この際、揮発性の酸を用いることは、反応液の除菌と留去により、脱塩の工程を省き簡便に生成物を分取することができ、有用である。このような酸としては炭酸が好適である。この場合の炭酸とは、

二酸化炭素として水溶液中にバブリング等により溶解し、解離により生成する炭酸を含む。またこれらの酸とアンモニアの塩を、反応液へのアンモニア源として用いることもでき、上記のような理由からアンモニア源の一部または全部として炭酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウムを用いることは好適である。

【0077】なお添加されるアクリル酸誘導体は必ずしも全量が溶解していなくてもよいが、反応液中での溶解性や分散性を改善するような溶媒、界面活性剤等を添加することもできる。また反応の進行による化合物の消費に応じて、連続的あるいは間欠的に化合物を添加してもよく、この場合の化合物の反応液中濃度は前記の限りではない。

【0078】反応液中に生成した L-アミノ酸は、その反応液中での性状により、遠心分離、膜ろ過、減圧乾燥、蒸留、溶媒抽出、塩析、イオン交換、各種クロマトグラフィーなど公知の方法で分取される。簡便には、以下のようにして達せられる。例えば、反応液からろ過、遠心、透析等により酵素、酵素処理物、形質転換微生物やその処理物を除去後、溶媒抽出、または反応液を酸性に調整し未反応の原料アクリル酸誘導体を析出させ、沈殿を除去する。

【0079】得られた上清の pH を再度、L-アミノ酸の等電点付近に調整し析出する誘導体を同様に回収する。このようにして反応液より生成物を収率・純度よく回収することができる。また、あらかじめ反応液から蒸留などにより余剰のアンモニアを除去すること、等電点での生成物の回収率を向上するために水を留去し濃度を高めておくこと等は有用である。

【0080】さらに簡便には、反応液の pH 調整を、揮発性の酸により実施する。変換率が十分高い場合は除菌後そのまま、また原料が多量に残存する場合は酸性として溶媒抽出し除去した後水・酸塩基を留去することにより、生成物を L-アミノ酸のアンモニウム塩として単離することができる。このような方法に適した揮発性の酸としては炭酸及びそのアンモニウム塩が好適である。

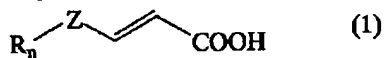
【0081】反応生成物の性質によっては、反応液中に生成物が蓄積することにより、反応速度が低下する場合がある。このような場合は、生成物の濃度に応じて反応液中に、アンモニアを含む水、生理食塩水、反応緩衝液を追加し連続的に希釈してゆく方法は好適である。また反応速度が低下した時点で菌を分取し、上清を生産物溶液として回収し、分取した菌は再度反応原料を含む溶液あるいは懸濁液に戻すことにより、反応速度を回復することができる。これらの方法は、微生物のアンモニアリアーゼ活性が維持される範囲において、何回でも繰り返すことができる。

【0082】本発明の原料となる化合物は、前記式

(1)

【0083】

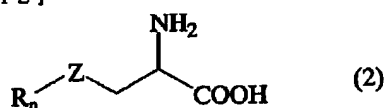
【化11】



【0084】（但し、式中Zはヘテロ原子を含んでいてもよい芳香環基を、Rは該芳香環上の置換基を表し、nは0以上の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。）で示されるアクリル酸誘導体である。また得られる化合物は、前記式（2）

【0085】

【化12】



10

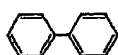
*



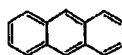
(6)



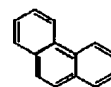
(7)



(8)



(9)



(10)

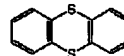
【0089】で表される基、下記式（11）～（15） 20※【化14】

【0090】

※



(11)



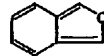
(12)



(13)



(14)

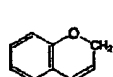


(15)

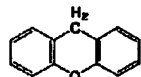
【0091】で表される基、下記式（16）～（20）

【0092】

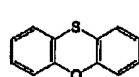
【化15】



(16)



(17)



(18)

30



(19)



(20)

★



(21)



(22)



(23)



(24)



(25)

【0095】で表される基、下記式（26）～（30）

【0096】

☆



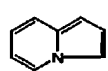
(26)



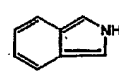
(27)



(28)



(29)



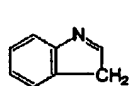
(30)

☆【化17】

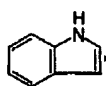
【0097】で表される基、下記式(31)～(34) *【化18】

【0098】

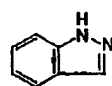
*



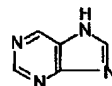
(31)



(32)



(33)

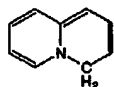


(34)

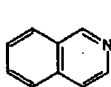
【0099】で表される基、下記式(35)～(38) ※【化19】

【0100】

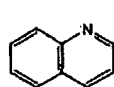
※



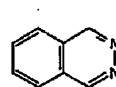
(35)



(36)



(37)

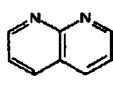


(38)

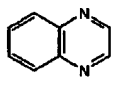
【0101】で表される基、下記式(39)～(42) ★【化20】

【0102】

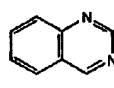
★



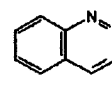
(39)



(40)



(41)

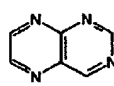


(42)

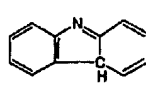
【0103】で表される基、下記式(43)～(45) ☆【化21】

【0104】

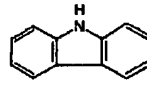
☆



(43)



(44)



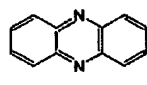
(45)

【0105】で表される基および下記式(46)～(50) ◆【0106】

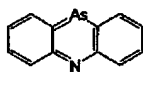
0)

◆

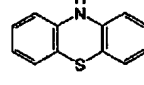
【化22】



(46)



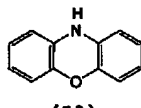
(47)



(48)



(49)



(50)

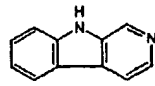
【0107】で表される基および下記式(51)～(55)

5)

【0108】

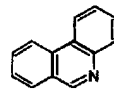
【化23】

23



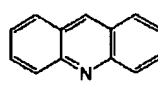
(51)

(13)

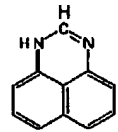


(52)

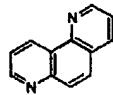
24



(53)



(54)



(55)

【0109】で表される基および下記式(56)～(58)

【0110】

【化24】



(56)



(57)



(58)

【0111】で表される基等が挙げられる。

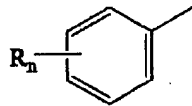
【0112】Rとしては、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基等が挙げられる。

【0113】nは、0以上で、芳香環の置換しうる位置の数から1を引いた数以下である整数とすることができる。nが2以上の場合には、Rは同一または相異なっているかまわらない。

【0114】また本発明の原料となる化合物は、前記式(1)において、R_n-Zが下記式(3)

【0115】

【化25】



(3)

【0116】(但し、Rは、ベンゼン環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～5の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているかよい。)で示される化合物である。

【0117】また得られる化合物は、前記式(2)において、R_n-Zが前記式(4)(但し、Rは、ベンゼン環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシ

ル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～5の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているかよい。)で示される化合物である。

20 【0118】式(1)の原料に対応する化合物でR_n-Zが式(3)で表される化合物の具体例としては2-シアノ桂皮酸、3-シアノ桂皮酸、4-シアノ桂皮酸、2-ヒドロキシ桂皮酸、3-ヒドロキシ桂皮酸、4-ヒドロキシ桂皮酸、3,4-ジヒドロキシ桂皮酸、2-ニトロ桂皮酸、3-ニトロ桂皮酸、4-ニトロ桂皮酸、2-カルボキシ桂皮酸、3-カルボキシ桂皮酸、4-カルボキシ桂皮酸、2-アミノ桂皮酸、3-アミノ桂皮酸、4-アミノ桂皮酸、2-クロロ桂皮酸、3-クロロ桂皮酸、4-クロロ桂皮酸、2-フルオロ桂皮酸、3-フルオロ桂皮酸、4-フルオロ桂皮酸、2-ブロモ桂皮酸、3-ブロモ桂皮酸、4-ブロモ桂皮酸、2-ヨード桂皮酸、3-ヨード桂皮酸、4-ヨード桂皮酸、2-メチル桂皮酸、3-メチル桂皮酸、4-メチル桂皮酸、2-メトキシ桂皮酸、3-メトキシ桂皮酸、4-メトキシ桂皮酸、4-イソプロピル桂皮酸、4-tert-ブチル桂皮酸、4-メトキシ-3-メチル桂皮酸等が挙げられる。

30 【0119】対応して生成するアミノ酸は、2-シアノ-L-フェニルアラニン、3-シアノ-L-フェニルアラニン、4-シアノ-L-フェニルアラニン、2-ヒドロキシ-L-フェニルアラニン、3-ヒドロキシ-L-フェニルアラニン、4-ヒドロキシ-L-フェニルアラニン、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン、2-ニトロ-L-フェニルアラニン、3-ニトロ-L-フェニルアラニン、4-ニトロ-L-フェニルアラニン、2-カルボキシ-L-フェニルアラニン、3-カルボキシ-L-フェニルアラニン、4-カルボキシ-L-フェニルアラニン、2-アミノ-L-フェニルアラニン、3-アミノ-L-フェニルアラニン、4-アミノ-L-フェニルアラニン、2-クロロ-L-フェニルアラニン、3-クロロ-L-フェニルアラニン、4-クロロ

50

-L-フェニルアラニン、2-フルオロ-L-フェニルアラニン、3-フルオロ-L-フェニルアラニン、4-フルオロ-L-フェニルアラニン、2-ブロモ-L-フェニルアラニン、3-ブロモ-L-フェニルアラニン、4-ブロモ-L-フェニルアラニン、2-ヨード-L-フェニルアラニン、3-ヨード-L-フェニルアラニン、4-ヨード-L-フェニルアラニン、2-メチル-L-フェニルアラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、4-メチル-L-フェニルアラニン、2-メトキシ-L-フェニルアラニン、3-メトキシ-L-フェニルアラニン、4-メトキシ-L-フェニルアラニン、4-イソプロピル-L-フェニルアラニン、4-tert-ブチル-L-フェニルアラニン、4-メトキシ-3-メチル-L-フェニルアラニン等である。

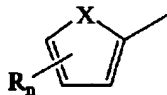
【0120】例えばLithospermum erythrorhizon由来酵素を用いた場合、原料として2-シアノ桂皮酸、4-シアノ桂皮酸、3-ヒドロキシ桂皮酸、4-ヒドロキシ桂皮酸、3, 4-ジヒドロキシ桂皮酸は好適であり、それぞれ2-シアノ-L-フェニルアラニン、4-シアノ-L-フェニルアラニン、3-ヒドロキシ-L-フェニルアラニン（メタチロシン）、4-ヒドロキシ-L-フェニルアラニン（チロシン）、3, 4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン（DOPA）等が得られる。

【0121】本発明は、置換基を有する桂皮酸誘導体すなわち式（3）においてnが1～5の化合物へ応用することが有効であるが、本発明の桂皮酸誘導体には桂皮酸を含み、それに対応しフェニルアラニン誘導体には、フェニルアラニンも含まれる。

【0122】また特に、本発明の原料となる化合物は、前記式（1）において、 R_n-Z が下記式（4）

【0123】

【化26】



(4)

【0124】（但し、式中XはS、O、NHまたはNR¹を表し、R¹は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rはヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。）であり、また得られる化合物は、前記式（2）において、 R_n-Z が前記式（4）

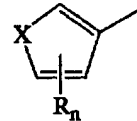
【0125】（但し、式中XはS、O、NHまたはNR¹を表し、R¹は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rはヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原

子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。）で示される化合物である。

【0126】また、本発明の原料となる化合物は、前記式（1）において、 R_n-Z が下記式（5）

【0127】

【化27】



(5)

【0128】（但し、式中XはS、O、NHまたはNR¹を表し、R¹は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rはヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。）であり、また得られる化合物は、前記式（2）において、 R_n-Z が前記式（5）

【0129】（但し、式中XはS、O、NHまたはNR¹を表し、R¹は炭素数1～6のアルキル基を表し、Rはヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数1～6のアルキル基または炭素数1～6のアルコキシ基を表す。nは0～3の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているもよい。）で示される化合物である。

【0130】このような化合物の具体例としては2-フランアクリル酸、3-フランアクリル酸、2-チエニルアクリル酸、3-チエニルアクリル酸、2-ピロリルアクリル酸、3-ピロリルアクリル酸等が挙げられる。

【0131】例えばLithospermum erythrorhizon由来酵素を用いた場合、原料として2-フランアクリル酸、3-フランアクリル酸、2-チエニルアクリル酸、3-チエニルアクリル酸、2-ピロリルアクリル酸、3-ピロリルアクリル酸は好適であり、対応してα-アミノ-2-フランプロピオン酸、α-アミノ-3-フランプロピオン酸、α-アミノ-2-チエニルプロピオン酸、α-アミノ-3-チエニルプロピオン酸、α-アミノ-2-ピロールプロピオン酸、α-アミノ-3-ピロールプロピオン酸が得られる。

【0132】本発明の方法は、光学純度の高いL-アミノ酸を、有機合成的に簡便に得られるアクリル酸誘導体を基質として1段階の反応で効率よく得ることができ

る。このようにして得られるL-アミノ酸は、高度な光学純度が要求される医薬・農業などファインケミカル分野の合成中間体として有用である。

【0133】

【実施例】以下実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら限定されるものではない。なお実施例及び比較例において、0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液pH8.5、基質としてL-フェニルアラニン10mMの存在下、30℃において毎分1μmoleの桂皮酸を遊離する酵素量を1unitと定義した。

【0134】また酵素タンパク質量の定量は、ビウレット法により、ウシ血清アルブミンを基準として定量し、酵素比活性はunit/mgタンパク質として表記した。またアクリル酸誘導体、およびアミノ酸の同定は、¹H-NMR、¹³C-NMR、および反応液をHPLCに供し標品とUV吸収強度を比較することにより実施した。

【0135】得られたアクリル酸誘導体の分離定量は、以下の分析条件で行った。

逆相HPLC分析条件

カラム：Shodex（昭和電工株式会社登録商標）

RSpak NN-614（昭和電工株式会社製）

カラム温度：40℃

溶離液：アセトニトリル/水/50mM H₂PO₄-K

H₂PO₄水溶液（pH3）=20/70/10

流速：1.0ml/min

検出：UV 210nmの吸収による

【0136】また、得られたアミノ酸の光学純度の分析は、以下の条件による光学分割HPLCで行った。

光学分割HPLC分析条件

カラム：Shodex（昭和電工株式会社登録商標）

ORpak CRX-853（昭和電工株式会社製）

カラム温度：室温（22℃）

溶離液：アセトニトリル/水=15/85 CuSO₄ 2.5mM

流速：1.0ml/min.

検出方法：UV 256nmの吸収による

【0137】実施例1：培養細胞による反応（バセリ）

培地Aの組成を表1に示す。

20 【表1】

成分	mg/L
リン酸2ナトリウム	150
硝酸カリウム	3000
硫酸アンモニウム	134
硫酸マグネシウム・7水和物	500
塩化カルシウム・2水和物	150
硫酸鉄(II)・7水和物	15
エチレンジアミン4酢酸	15
ニコチン酸	1
チアミン塩酸塩	10
ピリドキシン塩酸塩	1
m-イノシトール	100
硫酸マンガン・1水和物	10
ホウ酸	3
硫酸亜鉛・7水和物	2
モリブデン酸ナトリウム・2水和物	0.25
硫酸銅(II)	0.025
塩化コバルト・6水和物	0.025
ヨウ化カリウム	0.75
シュークロース	20000
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)	2

pH=5.5

【0138】上記組成の培地A 10Lを三角フラスコに分注し、それぞれにあらかじめ同培地で27℃、暗所、通気下継代培養（継代5世代）したバセリ（*Petrosselinumhortense*）細胞培養懸濁液を接種し、27℃、暗所、通気下に200rpmで10日間振盪培養した。さらに蛍光灯の光を照射しつつ24時間培養を継続し、得られた培養液をグラスファイバー濾紙にて吸引濾過し、約1.6kgのフェニルアラニンアンモニアラーゼを含む培養細胞を取得した。新鮮細胞重量当たり活性は

0.0051u/gであった。
【0139】得られた培養細胞2gを、種々のアクリル酸誘導体を0.1%を含む2M アンモニア/炭酸アンモニウム水溶液（pH=10）（2M アンモニア水と

2M炭酸アンモニウム水溶液を合わせてpHを調整したもの）10mLに懸濁し、30℃、24時間の攪拌により反応を行った。それぞれの反応により得られた生成物と濃度、および光学純度について表2示す。

【0140】比較例1：微生物由来酵素による反応

実施例1の、培養細胞に替えて、市販の*Rhodotorula glutinis*由来フェニルアラニンアンモニアラーゼ（シグマ社製）比活性0.44unit/mgを0.025mg相当添加し、同条件で反応を実施した際の生成物と濃度、および光学純度について表2に示す。

【0141】

【表2】

基質		桂皮酸	3-ヒドロキシ桂皮酸	3,4-ジヒドロキシ桂皮酸	2-シアノ桂皮酸	4-シアノ桂皮酸
生成物		L-フェニルアラニン	メタチロシン	L-DOPA	L-2-シアノフェニルアラニン	L-4-シアノフェニルアラニン
生成物濃度(mg/L)	実施例 1	210	180	170	240	250
	比較例 1	190	50	30	5	非検出
生成物光学純度(%)	実施例 1	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
	比較例 1	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	-

【0142】実施例2：培養細胞処理物による反応（バセリ）

実施例1と同様に培養して得られたバセリ培養細胞1.5kgを、3Lの0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH=8.8）に懸濁し、氷冷下、20分間の超音波破碎処理を行った。処理物より、不溶分を、10,000rpm、15分の遠心分離により沈降し、上清を分取した。

【0143】得られた抽出液に、氷冷下、攪拌しながら、粉碎した硫酸アンモニウムを40%飽和となるまで30分かけて徐々に添加し、溶液を10,000rpm、15分間遠心分離し沈澱を除去した。得られた上清に同様に硫酸アンモニウムを55%飽和となるまで添加し、溶液を10,000rpm、15分間遠心分離し、沈澱を回収した。沈澱を150mlの0.05M Tris-HCl緩衝液に溶解し、100倍容の同緩衝液中で4℃、24時間透析した。透析後の溶液170mlをフェニルアラニンアンモニリアーゼの粗酵素抽出*

*液として得た。総タンパク質量620mg、比活性は0.0205U/mgであった。

【0144】得られた粗抽出液1ml、2M アンモニア/炭酸アンモニウム水溶液（pH=10）（2M アンモニア水と2M 炭酸アンモニウム水溶液を合わせてpHを調整したもの）9mlの混合液に、種々の桂皮酸誘導体を0.5%となるよう添加し、30℃、24時間の攪拌により反応を行った。それぞれの反応により得られた生成物と濃度、および光学純度について表3示す。

【0145】比較例2：微生物由来酵素による反応
実施例2の、酵素粗抽出液に替えて、市販のRhodotorula graminis由来フェニルアラニンアンモニリアーゼ（シグマ社製）比活性0.44unit/mgを0.175mg添加し、同条件で反応を実施した際の生成物と濃度、および光学純度について表3に示す。

【0146】

【表3】

基質		桂皮酸	3-ヒドロキシ桂皮酸	3,4-ジヒドロキシ桂皮酸	2-シアノ桂皮酸	4-シアノ桂皮酸
生成物		L-フェニルアラニン	メタチロシン	L-DOPA	L-2-シアノフェニルアラニン	L-4-シアノフェニルアラニン
生成物濃度(mg/L)	実施例 2	1920	1600	1500	2010	2040
	比較例 2	1680	470	200	40	非検出
生成物光学純度(%)	実施例 2	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
	比較例 2	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	-

【0147】実施例3：植物組織処理物による反応（Cucumis sativus L.; キュウリ）

キュウリ（Cucumis sativus L.）種子を、水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレ上で25℃、72時間培養し発芽させた。さらに4時間の蛍光灯光照射ののち、約50gの胚軸を収穫した。

【0148】得られた胚軸組織を、氷冷下、乳鉢にて摩砕したのち、さらに摩砕物を全量、1mMのグルタチオンを含む0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH=8.8）100mlに懸濁後、20分間の超音波破碎

処理を行った。処理物より、不溶分を、10,000rpm、15分の遠心により沈降し、上清を分取した。

【0149】得られた抽出液に、氷冷下、攪拌しながら、粉碎した硫酸アンモニウムを30%飽和となるまで30分かけて徐々に添加し、溶液を10,000rpm、15分間遠心分離し沈澱を除去した。得られた上清に同様に硫酸アンモニウムを70%飽和となるまで添加し、溶液を10,000rpm、15分間遠心分離し、沈澱を回収した。沈澱を20mlの0.05M Tris-HCl緩衝液に溶解し、100倍容の同緩衝液

中で4℃、24時間透析した。透析後の溶液2.2mlを粗酵素抽出液として得た。総タンパク質量50.7mg、比活性は0.0307U/mgであった。

【0150】得られた粗抽出液0.1ml、2M アンモニア/炭酸アンモニウム水溶液(pH=10)(2M アンモニア水と2M 炭酸アンモニウム水溶液を合わせてpHを調整したもの)9.9mlの混合液に、種々の桂皮酸誘導体を0.5%となるよう添加し、30℃、24時間の攪拌により反応を行った。それぞれの反応により得られた生成物と濃度、および光学純度について表*10

基質	桂皮酸	3-ヒドロキシ桂皮酸	3,4-ジヒドロキシ桂皮酸	2-シアノ桂皮酸	4-シアノ桂皮酸
生成物	L-フェニルアラニン	メタチロシン	L-DOPA	L-2-シアノフェニルアラニン	L-4-シアノフェニルアラニン
生成物濃度(mg/L)	実施例3	1480	1300	1280	1940
	比較例3	1500	400	180	40
生成物光学純度(%)	実施例3	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
	比較例3	>99.9	>99.9	>99.9	-

【0153】実施例4：形質転換体の培養および形質転換体を用いた反応

反応に用いる形質転換体は、Lプロス(ポリペプトン1%、NaCl0.5%、酵母エキス0.5%、pH7.0)に2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地で一昼夜培養した菌体(白金耳をLプロス5~100mlで30℃、16時間培養したもの)を用いた。培養後の菌体を集菌し、培養液と等容量の生理食塩水で菌体を洗浄した後、この菌体を培養液の半容量の反応液(4Mアンモニア/炭酸アンモニウム(pH10.3))に懸濁し、終濃度0.2%(2000mg/L)の基質を加えて30℃で振盪しながら反応させた。この反応液の一部を一定時間毎に取り、菌体を遠心分離して除き、上清をHPLC分析して生成物量を定量した。

【0154】実施例5：cDNAライブラリーの作成とpal遺伝子の取得

ムラサキ(*Lithospermum erythrorhizon*)の細胞培養、cDNAライブラリーの作成およびpal遺伝子の取得はYazakiらの報告(Plant Cell Physiol. (1995), 36, 1319-1329; Biosci. Biotech. Biochem. (1997), 61(12), 1995-2003)に、チャ(*Camellia sinensis*)のcDNAライブラリーの作成およびpal遺伝子の取得はMatsumotoらの報告(Theor. Appl. Genet. (1994), 89(6), 671-675)に詳細に記載されている。発明者はこれら既存情報を参考に、いくつかの変更を加えてそれぞれの植物よりpal遺伝子を取得した。一連の手法は、塩基配列が明らかな全ての植物由来palに適用可能である。mRNAの取得材料としては培養細胞の他、pal遺伝子発現条件下の植物組織も利用可能である。

*4に示す。

【0151】比較例3：微生物由来酵素による反応
比較例として、粗酵素抽出液に替えて、市販のRhodotorula graminis由来フェニルアラニンアンモニアラーゼ(シグマ社製)比活性0.44unit/mgを0.16mg添加し、同条件で反応を実施した際の生成物と濃度、および光学純度について表4に示す。

【0152】

【表4】

【0155】(ムラサキcDNAライブラリーの作成)ムラサキの組織から調整した細胞を、LS培地(通常生育培地；インドール酢酸10μMおよびカイネチン0.1μMを含む)で一週間、25℃で培養した。得られた培養細胞を次にM9培地(シコニン生成培地；インドール酢酸10μMおよびカイネチン0.1μMを含む)に植え継ぎ、さらに2日間培養した。得られた培養細胞から、QuickPrep Micro mRNA Purification Kit(アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いて、Kit標準の使用方法に従いmRNAを調整した。次に得られたmRNAを鋳型としたRT-PCRをFirst-Strand cDNA Synthesis Kit(アマシャムファルマシアバイオテック社製)とOligo(dT)12-18プライマーを用いて行った。生成したDNA断片の混合物を遺伝子増幅PCR鋳型用のcDNAライブラリーとした。

【0156】(チャcDNAライブラリーの作成)凍結したチャの若葉(日照の良い午後に採取)から、上記ムラサキと同様にしてRT-PCRによりDNA断片を得、DNA断片の混合物を遺伝子増幅PCR鋳型用のcDNAライブラリーとした。

【0157】(pal遺伝子の取得)ムラサキに存在する2種のpal遺伝子(以下、それぞれ「LePAL1」、「LePAL2」と記載する。)は、既にYazakiらによりそれぞれ配列番号D83075およびD83076として、チャに存在するpal遺伝子(以下「CAMPAL」と記載する。)はMatsumotoらにより配列番号D26596として、GenBank、EMBL等のデータベースに公開されてい

る。それらの5'末端と3'末端の配列を用いて p a l 遺伝子特異的プライマーを作成した。その際、得られた DNA断片をプラスミドベクターに接続できるよう、適当な制限酵素サイトを両端に持つようにプライマーを設計した。

【0158】各種プラスミドベクターのマルチクローニングサイトに頻用される制限酵素の中から、適当なもの（p a l 遺伝子配列中に切断部位の無いもの）を検索した結果、LePAL2は5'末端側にEcoRIサイト、3'末端側にSalIサイトを、CAMPALは5'末端側にSmaIサイト、3'末端側にHindIIIサイトを用いることにした。LePAL1の5'末端側には適当なサイトが無かったため5'末端はEcoRVとし、切断後に生じる blunt末端をベクターのSmaIサイトの blunt末端とライゲーションするよう設計した。3'末端側はLePAL2と同様SalIとした。

【0159】プライマーの配列：

反応液組成：

鋳型 cDNA	0.5 ~ 2 μg
プライマー	各 100 pmol
dNTP 溶液	各 1 mM
10x 反応バッファー	10 μl
Ex Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)	2.5 U 計 50 μl

【0163】反応条件：

熱変性	94℃、30秒
アニーリング	55℃、60秒
伸長	72℃、120秒
サイクル数	24回

【0164】以上のような条件により鋳型 cDNA 量を数点ふって遺伝子断片増幅を試みたところ、理論的に算出される LePAL1、LePAL2、および CAMPAL の断片長約 2.1 kb の断片がほぼ特異的に増幅された。それぞれの断片をアガロースゲル電気泳動した後抽出・回収して精製した後、増幅に用いたプライマーを用いて塩基配列の解析を行ったところ、それぞれ LePAL1、LePAL2、および CAMPAL の配列情報と一致していることが確認できた。

【0165】実施例6：PAL活性を示す形質転換体の作成

得られた遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した。得られた制限酵素切断サイト付き LePAL1、LePAL2、および CAMPAL 断片をそれぞれ制限酵素 EcoRV と SalI、EcoRI と SalI、および SmaI と HindIII で切断した後、再度アガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した。これらの断片をそれぞれ EcoRV SalI および EcoRI SalI、SmaI-HindIII カット後アガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した pUC18 とライゲーションした (図1および図2)。

* (LePAL1)

【配列1】5'側 (EcoRV サイト付)；配列表1に記載の配列を有する 23 mer のオリゴヌクレオチド

【配列2】3'側 (SalI サイト付)；配列表2に記載の配列を有する 23 mer のオリゴヌクレオチド

【0160】(LePAL2)

【配列3】5'側 (EcoRI サイト付)；配列表3に記載の配列を有する 25 mer のオリゴヌクレオチド

【配列4】3'側 (SalI サイト付)；配列表4に記載の配列を有する 23 mer のオリゴヌクレオチド

【0161】(CAMPAL)

【配列5】5'側 (SmaI サイト付)；配列表5に記載の配列を有する 23 mer のオリゴヌクレオチド

【配列6】3'側 (HindIII サイト付)；配列表6に記載の配列を有する 23 mer のオリゴヌクレオチド

* 【0162】

【0166】これらのプラスミドで大腸菌 JM109 株

を形質転換して得られた形質転換体をイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 0.1 mM と 0.1% X-Gal を含む L 寒天平板培地に塗布し、37℃で24時間培養した。生じたコロニーのうち白色を呈しているものを数個選択し、そのプラスミドを調整し制限酵素切断パターンを確認したところ、目的のプラスミド pULePAL1、pULePAL2 および pUCAMPAL を持つ形質転換体が複数得られた。

【0167】得られた形質転換体から任意に各3株を選択し、実施例4に記載の方法に従い、Lブロス 5 ml、各株2連で培養した (2種×3株×2連)。培養開始後12時間後、2連のうち的一方にイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を 0.1 mM になるよう培養液に加えて、さらに4時間培養した。得られた培養液をそれぞれ遠心分離して集菌し、得られた菌体を実施例4に記載の方法で反応に供した。10時間反応後の生成物を HPLC により定量したところ、表5に示すように、各形質転換体はイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) の存在の如何に関わらずフェニルアラニンアンモニリアーゼ活性を示した (単位 mg/L)。

【0168】

【表5】

	非誘導時の活性	誘導時の活性
大腸菌 JM109	-	-
pULePAL1 形質転換体	1960	1470
pULePAL2 形質転換体	1990	1830
pUCAMPAL 形質転換体	1860	1520

【0169】実施例7：形質転換体を用いたフェニルアラニン誘導体の製造

実施例6で得たpULePAL1、pULePAL2およびpUCAMPAL形質転換体各1株を実施例4に記載の方法に従い、アンピシリン100ppmを含むLBロス100mlで培養した。この培養液をさらにアンピシリン100ppmを含むLBロス21を入れた5Lジャーファーマンターに接種し、30℃、800rpm、通気1ml/min、で10～12時間通気攪拌培養した。

【0170】対数増殖期後期～定常期初期の培養液を遠心分離して得た菌体を、4Mアンモニア/炭酸アンモニウム(pH10.3)1Lに再懸濁し、20gの基質(表6参照)を加え、30℃、800rpmで攪拌しながら反応を行った。反応液の一部を1時間毎に取り、反応液中に生じた生成物(表6参照)をHPLCにより定*

10*量した。基質濃度が約2%を保つよう基質を逐次添加しながら反応を継続して行ったところ、約10時間で反応液中に1～3%蓄積した(表6)。

【0171】反応終了後、反応液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して過剰のアンモニアを除去した後、濃塩酸を添加してpHを1とし、残留した基質を沈殿させ、沈殿物を濾過後、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮した。生成した沈殿を濾紙で濾過し、希塩酸(0.1N)で洗浄した後、真空乾燥した。この乾燥標品の純度は99%以上であった。不純物として検出されたのはいずれの系でも基質である桂皮酸誘導体、アクリル酸誘導体であった。これらの誘導体の光学純度を前述の方法に従い検定したところ、いずれもL体のみが検出され、D体は検出限界以下であった。

【0172】

【表6】

基質	桂皮酸	3-ヒドロキシ桂皮酸	3,4-ジヒドロキシ桂皮酸	2-シアノ桂皮酸	4-シアノ桂皮酸	2-フランアクリル酸
生成物	L-フェニルアラニン	メタチロシン	L-DOPA	L-2-シアノフェニルアラニン	L-4-シアノフェニルアラニン	α -アミノ-2-フランプロピオン酸
生成物濃度(mg/L)	pULePAL1 形質転換体	19200	12100	12000	20100	20400
	pULePAL2 形質転換体	16800	13000	9800	21700	24900
	pUCAMPAL 形質転換体	15800	14700	10500	18600	22600
生成物光学純度(%)	pULePAL1 形質転換体	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
	pULePAL2 形質転換体	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
	pUCAMPAL 形質転換体	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9

【0173】本実施例においては、植物起源のフェニルアラニンアンモニアリアーゼが一般に本発明に有効であることを示すため、アミノ酸配列の異なる複数のフェニルアラニンアンモニアリアーゼを用いた(キュウリは配列未同定)。配列相同性を図3に示すが、これらは相互にアミノ酸配列として10～20%異なる酵素であるにも関わらず、いずれも本発明において十分に有効な特徴

を有すること、すなわち、微生物由来の同酵素と比較して遙かに高いフェニルアラニン誘導体変換生成能を有することが明らかとなった。

【0174】

【発明の効果】本発明によれば、植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼを用いることによって、アクリル酸誘導体を原料として、簡便で効率よく、対応す

るアミノ酸を得ることができ、特にフェニル基上に種々の置換基を有するL-フェニルアラニン誘導体を簡便に効率よく得ることができる。

【0175】本発明のL-アミノ酸の製造法により得られるL-アミノ酸は、医薬中間体、農薬中間体をはじめとする生理活性有機化合物のキラルビルディングブロックとして幅広い分野に有用であり、主として医薬中間体として有用である。

【0176】

【図面の簡単な説明】

【図1】LePAL1及びLePAL2を示すムラサキPAL発現プラスミドの構築図である。

【図2】CAMPALを示すチャPAL発現プラスミドの構築図である。

【図3】PALアミノ酸配列の相同性の一例を示す図である。

【0177】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Biological Production of Phenylalanine Derivatives

<130> Primers for PAL

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Lithospermum erythrorhizon

<400> 1

* aaqatatcat qqaaaccata qtq 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Lithospermum erythrorhizon

<400> 2

ttgtcgcatt aacagattgq aag 23

<210> 3

<211> 25

10 <212> DNA

<213> Lithospermum erythrorhizon

<400> 3

aaqaattcat qqaaaatqqa aatqg 25

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Lithospermum erythrorhizon

<400> 4

ttgtcgacta acatattqga aga 23

20 <210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Camellia sinensis

<400> 5

aaccgqgqat qqataqtacc acc 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

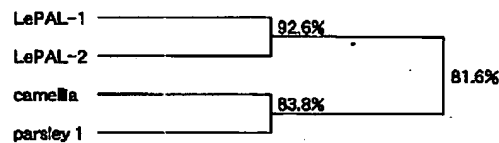
<213> Camellia sinensis

30 <400> 6

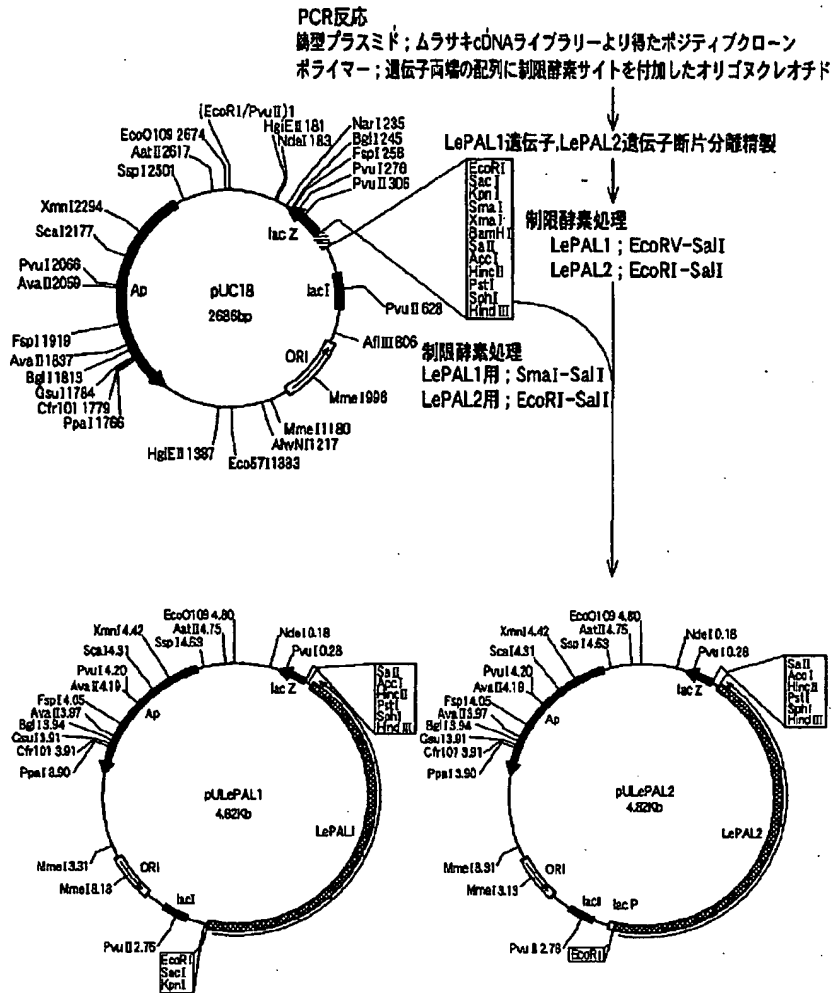
ttaagcttct aacagataqg aag 23

*

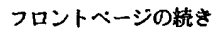
【図3】



【図1】



PCR反応
鋳型プラスミド；チャcDNAライブラリーより得たポジティブクローン
ポリマー；塩伝子両端の配列に制限酵素サイトを付加したオリゴヌクレオチド



Fターム(参考) 4B024 AA03 BA07 BA71 CA04 DA06
EA04 GA11 HA12
4B064 AE03 AE29 AE43 AE45 AE48
CA21 CB30 CD07 CD12 DA01
DA11

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成17年10月20日(2005.10.20)

【公開番号】特開2003-225092(P2003-225092A)
 【公開日】平成15年8月12日(2003.8.12)
 【出願番号】特願2002-184469(P2002-184469)
 【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 13/04

C 1 2 P 13/22

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 13/04

C 1 2 P 13/22

【手続補正書】

【提出日】平成17年6月20日(2005.6.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

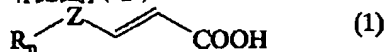
【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

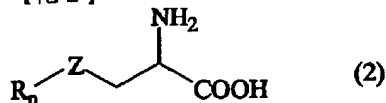
【請求項1】

下記式(1)



(但し、式中Zはヘテロ原子を含んでもよい芳香環基を、Rは該芳香環上の置換基を表し、nは0以上の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているいてもよい。)で示されるアクリル酸誘導体に、アンモニアの存在下、植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼを作用させることを特徴とする、下記式(2)

【化2】

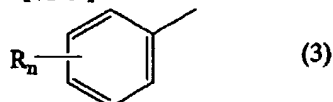


(但し、式中Zはヘテロ原子を含んでもよい芳香環基を、Rは該芳香環上の置換基を表し、nは0以上の整数を表し、nが2以上の場合、Rは同一または相異なっているいてもよい。)で示されるL-アミノ酸の製法。

【請求項2】

R_n-Z-が下記式(3)

【化3】



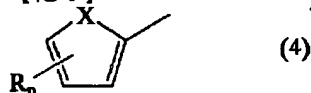
(但し、Rは、ベンゼン環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシ基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭

素数 1～6 のアルキル基または炭素数 1～6 のアルコキシ基を表す。n は 0～5 の整数を表し、n が 2 以上の場合、R は同一または相異なっているいてもよい。) である請求項 1 に記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 3】

Rⁿ-Z-が下記式 (4)

【化 4】

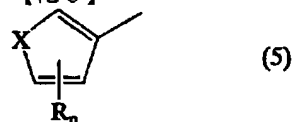


(但し、式中 X は S、O、NH または NR¹ を表し、R¹ は炭素数 1～6 のアルキル基を表し、R はヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数 1～6 のアルキル基または炭素数 1～6 のアルコキシ基を表す。n は 0～3 の整数を表し、n が 2 以上の場合、R は同一または相異なっているいてもよい。) である請求項 1 に記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 4】

Rⁿ-Z-が下記式 (5)

【化 5】



(但し、式中 X は S、O、NH または NR¹ を表し、R¹ は炭素数 1～6 のアルキル基を表し、R はヘテロ環上の置換基であり、シアノ基、水酸基、カルボキシル基、アミド基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基、炭素数 1～6 のアルキル基または炭素数 1～6 のアルコキシ基を表す。n は 0～3 の整数を表し、n が 2 以上の場合、R は同一または相異なっているいてもよい。) である請求項 1 に記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 5】

フェニルアラニンアンモニアリアーゼを含む植物培養細胞及び/またはその処理組成物を用いることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 6】

フェニルアラニンアンモニアリアーゼを含む植物組織処理組成物を用いることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 7】

植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子を植物中において発現可能に存在させ、その形質転換植物栽培物または該栽培物の処理物を用いることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 8】

植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子を微生物中において発現可能に存在させ、その形質転換微生物培養物、処理物または培養物から得た酵素を用いることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 9】

植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子が、Lithospermum erythrorhizon 由来の p a l 2 遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と 70% 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子である請求項 7 または 8 に記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 10】

植物由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子が、*Lithospermum erythrorhizon* 由来の p a l 2 遺伝子の塩基配列より導かれるアミノ酸配列と 80 % 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子である請求項 7 または 8 に記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 11】

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の由来植物が、*Lithospermum* 属及び／または *Camellia* 属であることを特徴とする請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 12】

微生物が細菌、酵母及び／または糸状菌である請求項 8 ないし 11 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 13】

細菌が大腸菌である請求項 12 に記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 14】

前記式 (3) の R の少なくとも一つが水酸基、シアノ基、カルボキシル基、アミド基、ハロゲン基、アミノ基、ニトロ基、ヒドロキシメチル基及び炭素数 1～6 のアルキル基からなる群から選ばれたいずれかの基であることを特徴とする請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 15】

前記式 (3) の置換基 R がシアノ基、水酸基、ニトロ基またはカルボキシル基のいずれかであり、且つ n が 1 であることを特徴とする請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 16】

L-アミノ酸が L-フェニルアラニンであることを特徴とする請求項 2、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 17】

前記式 (4) の X が O、S 及び NH からなる群から選ばれたいずれかであることを特徴とする請求項 3、5 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

【請求項 18】

前記式 (5) の X が O、S 及び NH からなる群から選ばれたいずれかであることを特徴とする請求項 4 ないし 13 のいずれかに記載の L-アミノ酸の製法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.